

明細書

子宮内膜症関連疾患の診断方法

5

技術分野

この出願の発明は、子宮内膜症関連疾患の分子生物学的な診断方法に関するものである。またこの出願の発明は、子宮内膜症関連疾患の分子メカニズムを利用した当該疾患の治療薬および治療方法に関するものである。

背景技術

子宮内膜症は一般的な産婦人科疾患であり、生殖可能年齢にある全女性の10%に影響している（非特許文献1）。子宮内膜症の組織は正所性子宮内膜のように周期的な増殖と崩壊を経て、周期的月経困難症、性交疼痛症、骨盤痛、および月経時血尿の原因になる。さらに不妊症患者の30～40%がこの疾患有していることも報告されている（非特許文献2）。一部の患者で子宮内膜細胞が転移し、異所的に増殖する際のメカニズムは未だに不明であるが、炎症性サイトカインの脱調節化が子宮内膜症の進行に寄与している可能性がある（非特許文献3、4）。事実、単球の活性化と腹腔内への移動が、子宮内膜症において最も一貫して報告されている免疫学的異常性の一つとなっている（非特許文献5～8）。

ダイオキシンは内分泌攪乱物質の一種であり、環境中に遍在している。3,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD；ダイオキシン) はダイオキシン群の中でも最も毒性が高い物質であり、各種の毒性効果（例えば、免疫毒性、血液毒性、催奇形性、および発ガン性など）を有している（非特許文献9、10）。TCDD および関連化合物が誘導する遺伝子発現の変化は、毒素がアリル炭化水素受容体 (AhR) に結合した時点で開始され、次にアリル炭化水素受容体

核トランスロケーター (ARNT) と二量体を形成して、XRE (異物応答配列) モチーフを含む遺伝子調節要素と相互作用する複合体を形成する (非特許文献 11、12)。サルを TCDD に慢性曝露させると、用量依存的に軽度から重度の子宮内膜症が発現したことから (非特許文献 13)、ダイオキシンと子宮内膜症の関連性について幾つかの研究が行われた (非特許文献 14~18)。しかしながら TCDD 曝露は子宮内膜症に相関しないと言う結果が最近報告され (非特許文献 19、20)、ダイオキシン曝露と子宮内膜症の関連性は不明のままとなっている。

なおこの出願の発明者らは、IgE 依存性ヒスタミン放出因子 (Histamine Releasing Factor:HRF) を含む TCDD 標的遺伝子を同定している (非特許文献 21~23)。しかしながら、このような TCDD 標的遺伝子産物としての HRF と子宮内膜症との関係は一切知られていない。

- 非特許文献 1 : Wheeler J.M. J. Reprod Med. 1989, 34(1):41-6
15 非特許文献 2 : Candiani G.B. et al. Obstet Gynecol. Surv. 1991,
46(6):374-82
非特許文献 3 : Garcia-Velasco J.A. and Arici A. Fertil Steril. 1999,
71(6):983-93
非特許文献 4 : Barcz et al. Med. Sci. Monit. 2000, 6(5):1042-6
20 非特許文献 5 : Jolicoeur C. et al. Am. J. Pathol. 1998, 152(1):125-33
非特許文献 6 : Lebovic D.I. et al. Fertil Steril 2001, 75(1):1-10
非特許文献 7 : Hornung D. et al. Am. J. Pathol. 2001, 158(6):1949-54
非特許文献 8 : Blumenthal R.D. et al. Am. J. Pathol. 2000, 156(5):1581-
8
25 非特許文献 9 : Chapman D.E. and Schiller C.M. Toxicol Appl. Pharmacol.
1985, 78(1):147-57
非特許文献 10 : McGregor D.B. et al. Environ Health Perspect. 1998, 106
Suppl 2:755-60
非特許文献 11 : Sagawa K. and Fujii-Kuriyama T. J. Biochem. (Tokyo)
30 1997, 122(6):1075-9

非特許文献 12 : Nebert D.W. Crit. Rev. Toxicol. 1989, 20(3):153-74

非特許文献 13 : Rier S.E. et al. Fundam. Appl. Toxicol. 1993, 21(4):433-

41

非特許文献 14 : Gibbons A. Science 1993, 262(5183):1373

5 非特許文献 15 : Obsteen K.G. and Sierra-Rivera E. Endocrinol. 1997,
15(3):301-8

非特許文献 16 : Bruner-Tran K.L. et al. Gynecol. Obstet. Invest. 1999, 48
Suppl. 1:45-56

10 非特許文献 17 : Johson K.L. et al. Environ Health Perspect 1997,
105(7):750-5

非特許文献 18 : Yang J.Z. and Foster W.G. Toxicol. Ind. Health 1997,
13(1):15-25

非特許文献 19 : Igarashi T. et al. Endocr. J. 1999, 46(6):765-72

非特許文献 20 : Pauwels A. et al. Hum. Reprod. 2001, 16(10):2050-5

15 非特許文献 21 : Oikawa K. et al. Cancer Res. 2001, 61(15):5707-9

非特許文献 22 : Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002,
290(3):984-7

非特許文献 23 : Ohbayashi et al. FEBS Lett. 2001, 508(3):341-4

20

発明の開示

子宮内膜症の診断は、従来は、腹腔内視鏡による観血的な方法以外には有効な方法は存在しなかった。

25

一方、各種のヒト疾患に対して、その疾患に特異的なマーカータンパク質やその遺伝子発現を指標とする分子生物学的診断が普及しつつある。この方法は、大がかりな設備を必要とせず、被験者への負担も少ないため、自覚症状のない多くの被験者に対しても広範囲に実施することが可能である。しかしながら、子宮内膜症については、このような分子生物学的な診断方法を行うための有効なマーカ

ータンパク質やその遺伝子は知られていない。

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、子宮内膜症に密接に関連するマーカーを利用した分子生物学的な診断・治療方法を提供することを課題としている。
5

またこの出願の発明は、この診断・治療方法に使用する各種材料を提供することを課題としている。

10 この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(17)の発明を提供する。

(1) 被験者の生体試料におけるヒスタミン放出因子（HRF タンパク質）の存在量を測定し、HRF タンパク質量を正常生体試料のそれと比較し、正常生体試料と比較して有意に高い HRF タンパク質量を示す被験者を、子宮内膜症関連疾患の患者またはそのハイリスク者と判定することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。
15

(2) HRF タンパク質を認識する抗体。

20 (3) 前記発明(2)の抗体とは異なるエピトープと結合する抗体。

(4) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列の 90～130 位から選択された連続した 5～20 個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた前記発明
25 (2) または(3)の抗体。

(5) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列の 1～95 位から選択された連続した 5～20 個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた前記発明(2)
または(3)の抗体。

(6) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列の 115~172 位から選択された連続した 5~20 個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた前記発明(2)または(3)の抗体。

5 (7) 少なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料を前記発明(2)の抗体を固定化した担体と接触する工程；
- (b) 工程(a)で生体試料と接触させた担体を洗浄する工程；
- (c) 工程(b)で洗浄した担体に標識化した前記発明(3)の抗体を接触させる工程；
- (d) 担体上の結合標識あるいは遊離標識を測定する工程；

10 (e) 工程(d)で測定された標識量を HRF タンパク質量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
(f) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF タンパク質量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、
を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

15

(8) 少なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料を組織固定化処理に付す工程；
- (b) 工程(a)で調製された組織固定化標本を切片とする工程；
- (c) 工程(b)で得られた切片化組織を前記発明(2)の抗体による免疫組織染色に付す工程；
- (d) 工程(c)による免疫組織染色の程度を HRF タンパク質量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
- (e) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF タンパク質存在量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、

25 を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

(9) 少なくとも標識化した前記発明(2)の抗体を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患診断キット。

30 (10) 少なくとも以下の要素：

(a) 前記発明(2)の抗体；および
(b) 標識化した前記発明(3)の抗体
を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患診断キット。

5 (11) 少なくとも以下の要素：

(a) 前記発明(2)の抗体を固定化した担体；および
(b) 標識化した前記発明(3)の抗体
を含むことを特徴とする子宮内膜症診断キット。

10 (12) HRF タンパク質を認識し、かつ HRF タンパク質の活性を中和する抗体。

(13) 請求項 12 の抗体を含有することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の治療薬。

15 (14) 請求項 12 の抗体または請求項 13 の治療薬を体内に投与することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の治療方法。

すなわち、この出願の発明者らは、子宮内膜組織と子宮内膜症移植片における TCDD 標的遺伝子（HRF、CYP1A1）の発現を調べた結果、子宮内膜症の進行と HRF 発現レベルに高い相関関係を見出してこの出願の発明を完成させた。

なおこの発明において、「子宮内膜症関連疾患」とは、子宮内膜症、および子宮内膜症を原因とする月経困難症、不妊症および子宮腺筋症等を意味する。「診断」とは、被験者が子宮内膜症関連疾患に罹患しているか否かの判定、将来的に子宮内膜症関連疾患に罹患する危険性が存在するか否かの判定、および治療後に子宮内膜症関連疾患を再発する危険性が存在するか否かの判定を意味する。また、診断には、子宮内膜症関連疾患の罹患やその危険性がどの程度であるか測定することも含まれる。

30 なおこの発明において、「HRF ポリヌクレオチド」とは HRF タンパク質をコ

ードするポリヌクレオチド [プリンまたはピリミジンが糖に β -N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル (ATP、GTP、CTP、UTP；または dATP、dGTP、dCTP、dTTP) が結合した分子を意味する。具体的には、HRF タンパク質をコードするゲノム DNA、ゲノム DNA から転写される mRNA、mRNA から合成される cDNA である。また、2 本鎖であっても 1 本鎖であってもよい。さらに、これらのゲノム DNA や mRNA、cDNA のセンス鎖およびアンチセンス鎖も含まれる。また「ポリヌクレオチド」とは、前記のヌクレオチドが 100 個以上結合した分子を言い、「オリゴヌクレオチド」とは 2-99 個連結した分子を言う。さらに「タンパク質」および「ペプチド」とは、アミド結合（ペプチド結合）によって互いに結合した複数個のアミノ酸残基から構成された分子を意味する。特にアミノ酸残基 2-33 個のものを「オリゴペプチド」、34 個以上のものを「ポリペプチド」と記載する。

また、配列表に示した塩基配列およびアミノ酸配列については、1 以上の塩基の付加、欠失、他の塩基への置換、あるいはこれらの塩基変異に基づく 1 以上のアミノ酸残基の付加、欠失および他のアミノ酸への置換をも包含する。

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。なお、用語は基本的には IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるものであり、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。またこの発明を実施するため使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、薬剤の調製は Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 に、遺伝子工学および分子生物学的技術は J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); Ausubel, F. M. et al., Current Protocols

in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 ; 日本生化学会編、「続生化学実験講座 1、遺伝子研究法 II」、東京化学同人 (1986);日本生化学会編、「新生化学実験講座 2、核酸 III (組換え DNA 技術)」、東京化学同人 (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68

- 5 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F),
10 Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in Enzymology", Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 218, Academic Press, New York (1993); S. Weissman (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 303, Academic Press, New York (1999); J. C. Glorioso et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 306,
15 Academic Press, New York (1999)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

20

図面の簡単な説明

図 1 は、正常子宮内膜組織、子宮内膜症患者に由来する正所性子宮内膜組織、および子宮内膜症移植片における HRF と CYP1A1 の発現を調べた結果である。

- 25 (A) HRF mRNA レベルはノーザンプロット分析により調べた。プロットの再プローブをヒト β アクチンプローブを用いて行い、トータル RNA レベルを決定した。ノーザンプロットにより調べた試料中の CYP1A1 mRNA レベルはサザンプロット分析を用いた定量的 RT-PCR により決定した。定量の精度を確認するため、5 倍の異なる濃度の cDNA 試料 (1x および 5x) を PCR テンプレートとして用
30 い、同様な配置で調べた。 β アクチンを mRNA 量に対する内部対照として用い

た。(B)HRF および CYP1A1 の mRNA レベルに対する画像表示を同様に示す。 mRNA レベルは densitometry (MOLECULAR IMAGER, Nippon Bio-Rad) を用いて β アクチンシグナルに対して正規化した。試料 11-2A は HRF の mRNA レベル、10-2A は CYP1A1 の mRNA レベルを示し、任意に 10 に設定した。複数の試料が一個人由来である場合には、平均値を計算して表示した。エラーバーは複数試料の最大値を表す。12-1、7-1、8-1 および 6B は正常な子宮内膜組織であり、アステリスクが印字された 1C は子宮内膜症患者の正所性子宮内膜である。

図 2 は、子宮内膜症移植片における HRF 発現を調べた結果である。(A)正常な子宮内膜組織、子宮内膜症患者の正所性子宮内膜組織、および子宮内膜症移植片における HRF 発現のノーザンプロット分析の結果である。プロットはヒト β アクチンプローブを用いて再プロープを行い、トータル RNA レベルを決定した。カラム上の N、Eu および En はそれぞれ正常な子宮内膜組織、子宮内膜症患者の正所性子宮内膜組織、および子宮内膜症移植片を示す。(B)図 1A および図 2A において調査した試料について、ノーザンプロット分析により測定した HRF mRNA レベルのグラフ表示である。HRF mRNA レベルは densitometry (MOLECULAR IMAGER, Nippon Bio-Rad) を用いて β アクチンシグナルに対して正規化した。試料 6B の mRNA レベルを任意に 1 に設定した。複数の試料が一個人由来である場合には、平均値を計算して表示した。エラーバーは複数試料の最大値を表す。

図 3 は、HRF および CD68 発現の免疫組織化学的分析の結果である。茶色の染色で陽性部分が可視化されている。逆染色にはヘマトキシリソ用いた。(A) および(B)正常な子宮内膜組織における HRF タンパク質の検出 (A:増殖フェーズ、B:分泌フェーズ、原図倍率 $\times 200$)。(C)卵巣の子宮内膜症移植片内部における HRF タンパク質の検出 (原図倍率 $\times 200$)。(D)子宮内膜症移植片の形態を示す連続切片の H&E 染色 (原図倍率 $\times 200$)。(E)さらに高倍率で(C)と同じ視野の HRF タンパク質を検出したもの (原図倍率 $\times 400$)。(F)子宮内膜症移植片の連続切片における CD68 陽性マクロファージの免疫組織化学的局在 (原図倍率 \times

400)。

図4は、移植アッセイの結果である。(A) NIH3T3 細胞内の HRF タンパク質のウエスタンプロット分析の結果。wt: 親の NIH3T3 細胞、HRF:HRF を含むレ⁵トロウイルスベクターによる感染後に安定して HRF を発現する細胞株(pMSCV-HRF-3T3)、vector: 空のベクターを感染させた対照細胞(pMSCV-3T3)。(B) ヌードマウスにおける HRF 過剰発現細胞の示す高い移植効率を示す。縦軸上のマークは次の状態を示す。+++ : 無数の移植コロニーが観察された状態、++ : 数十個の移植コロニーが観察された状態、+ : 数個の移植コロニーが観察された状態、- : 移植コロニーは観察されなかった状態。対照細胞または HRF 過剰¹⁰発現細胞を注射した個々のマウスは、それぞれ白丸または黒丸により示す。

発明を実施するための最良の形態

15

この出願の発明(1)の診断方法は、被験者の生体試料におけるヒスタミン放出因子(HRF タンパク質)の存在量を測定し、この HRF タンパク質量を指標として子宮内膜症関連疾患を診断する方法である。すなわち、HRF タンパク質量が正常生体試料と比較して有意に多い被験者を子宮内膜症関連疾患の患者またはそのハイリスク者と判定する。すなわち、HRF タンパク質の存在量が有意に多い被験者を子宮内膜症関連疾患の患者またはそのハイリスク者と判定する。HRF 遺伝子から発現する HRF タンパク質の存在量は子宮内膜症関連疾患と密接に関連することから、被験者の生体試料(例えば子宮内膜組織等)におけるこの HRF タンパク質量を指標として子宮内膜症の診断を行うことができる。また²⁰ HRF タンパク質量が「有意に多い」とは、被験者の HRF タンパク質量が正常生体試料(すなわち健常者の生体試料)において測定された HRF タンパク質量と比較して、10%以上、好ましくは30%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは100%以上である場合を意味する。またさらに、この「有意に多²⁵い」とは、例えば同一被験者の複数試料についての HRF ポリヌクレオチド発現量の平均値と、複数の正常試料における同様の平均値とを統計的に検定した場合、³⁰

前者が後者よりも有意に多い場合である。

以上のとおりの HRF タンパク質量を指標とする発明(1)の診断方法は、公知の遺伝子工学および分子生物学的技術に従い、当該分野で特定のタンパク質量を検知測定するために知られた手法、例えば *in situ* ハイブリダイゼーション、ウェスタンプロッティング、各種の免疫組織学的方法などによって HRF タンパク質量を検知・測定して実施することができる。こうした技術を利用した HRF タンパク質量測定系、子宮内膜症関連疾患の検出系、子宮内膜症関連疾患のリスク検出系、それに利用する試薬、方法、プロセス、解析プログラムなどは、すべてこの発明の技術およびそれに利用するシステムに含まれる。

この出願は、前記の発明(1)の診断方法に使用する材料として、特に以下の発明(2)および(3)の抗体を提供する。

発明(2)の抗体は、HRF タンパク質を特異的に認識する抗体（抗 HRF 抗体）である。なおここで言う「抗体」とは、広義の意味で使用されるものであってよく、所望の HRF ポリペプチドおよび関連ペプチド断片に対するモノクローナル抗体の単一のものや各種エピトープに対する特異性を持つ抗体組成物であってよく、また 1 値抗体または多価抗体並びにポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含むものであり、さらに天然型(intact)分子並びにそれらのフラグメントおよび誘導体も表すものであり、 $F(ab')_2$ 、 Fab' および Fab といったフラグメントを包含し、さらに少なくとも二つの抗原又はエピトープ(epitope)結合部位を有するキメラ抗体若しくは雑種抗体、または、例えば、クワドローム(quadrome)、トリオーム(triome)などの二重特異性組換え抗体、種間雑種抗体、抗イディオタイプ抗体、さらには化学的に修飾あるいは加工などされてこれらの誘導体と考えられるもの、公知の細胞融合またはハイブリドーマ技術や抗体工学を適用したり、合成あるいは半合成技術を使用して得られた抗体、抗体生成の観点から公知である従来技術を適用したり、DNA 組換え技術を用いて調製される抗体、本明細書で記載し且つ定義する標的抗原物質あるいは標的エピトープに関して中和特性を有したりする抗体または結合特性を有する抗体を包含している。

てよい。特に好ましい抗体は、天然型の HRF タンパク質量（ポリペプチド）を特異的に識別できるものであり、例えば、前記発明(4)～(6)の抗体等である。

すなわち、発明(4)～(6)の抗体はそれぞれ配列番号 2 のアミノ酸配列からなる
5 HRF タンパク質の部分ペプチドを抗原として調製された抗体であり、それぞれ
HRF タンパク質の異なる部位を認識する抗体である。このような抗体作成のた
めの HRF ペプチドは、例えばペプチド合成機を使用して、例えば Fmoc-bop 法
で合成する。HRF ペプチドの N 末端にはシステインを導入してもよい。合成し
たペプチドは μ Bondasphere、C18 カラム（Waters）などを用いた高速液体ク
ロマトグラフィーなどにより精製して免疫抗原として使用する。
10

発明(3)の抗体は、前記発明(2)の抗体とは異なるエピトープに結合する抗体で
ある。このような抗体は、前記発明(2)の抗体作製のためのオリゴペプチドとは
異なる断片を免疫原とすることによって、前記と同様のポリクローナル抗体また
15 はモノクローナル抗体として作製される。例えば、前記発明(4)～(6)の抗体は、
いずれか一が発明(2)の抗体となり、他が発明(3)の抗体となる。

このような抗体は、例えばポリクローナル抗体の場合には、HRF タンパク質
やその一部断片（オリゴペプチド）を免疫原として動物を免役した後、血清から
20 得ることができる。あるいは、HRF タンパク質ポリヌクレオチドの組換えベク
ターを注射や遺伝子銃によって、動物の筋肉や皮膚に導入した後、血清を採取す
ることによって作製することができる。動物としては、マウス、ラット、ハムス
ター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、サル、ニワトリ
などが用いられる。さらには、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して
25 選択するのが好ましい場合もある。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われ、例えば村松
繁、他編、実験生物学講座 14 、免疫生物学、丸善株式会社、昭和 60 年、日
本生化学会編、統生化学実験講座 5 、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986
30 年、日本生化学会編、新生化学実験講座 12 、分子免疫学 III、抗原・抗体・

補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物などの腹腔内または皮下に注射することにより行われる。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。免疫化剤を（必要に応じアジュvantと共に）一回又はそれ以上の回数哺乳動物に注射することにより免疫化される。代表的には、該免疫化剤及び／又はアジュvantを哺乳動物に複数回皮下注射あるいは腹腔内注射することによりなされる。免疫化剤は、上記抗原ペプチドあるいはその関連ペプチド断片を含むものが挙げられる。免疫化剤は、免疫処理される哺乳動物において免疫原性であることの知られているタンパク質（例えば上記担体タンパク質類など）とコンジュゲートを形成せしめて使用してもよい。アジュvantとしては、例えばプロイント完全アジュvant、リビ(Ribi)アジュvant、百日咳ワクチン、BCG、リピッドA、リポソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。

15 ポリクローナル抗体を含む抗血清は、免疫された動物を所定の期間飼育した後、当該動物から採血した血液から調製することができる。得られた抗血清は、HRFを認識するものであることを確認した後、本発明所定の活性成分として供される。

この発明において、抗 HRF 抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体として得られたものを使用することもできる。抗原物質に対して作製されるモノクローナル抗体は、培養中の一連のセルラインにより抗体分子の産生を提供することのできる任意の方法を用いて產生される。修飾語「モノクローナル」とは、実質上均質な抗体の集団から得られているというその抗体の性格を示すものであって、何らかの特定の方法によりその抗体が产生される必要があるとみなしてはならない。個々のモノクローナル抗体は、自然に生ずるかもしれない変異体が僅かな量だけ存在しているかもしれないという以外は、同一であるような抗体の集団を含んでいるものである。モノクローナル抗体は、高い特異性を持ち、それは単一の抗原性をもつサイトに対して向けられているものである。異なる抗原決定基（エピトープ）に対して向けられた種々の抗体を典型的には含んでいる通常の（ポリクローナル）抗体調製物と対比すると、それぞれのモノクローナル抗体

は当該抗原上の単一の抗原決定基に対して向けられているものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養により合成され、他の免疫グロブリン類の夾雜がないあるいは少ない点でも優れている。モノクローナル抗体は、ハイブリッド抗体及びリコンビナント抗体を含むものである。それら
5 は、所望の生物活性を示す限り、その由来や免疫グロブリンクラスやサブクラスの種別に関わりなく、可変領域ドメインを定常領域ドメインで置き換えたり、あるいは軽鎖を重鎖で置き換えたり、ある種の鎖を別の種の鎖でもって置き換えたり、あるいはヘテロジニアスなタンパク質と融合せしめたりして得ることがで
きる（例えば、米国特許第 4816567 号；Monoclonal Antibody Production
10 Techniques and Applications, pp.79-97, Marcel Dekker, Inc., New York,
1987 など）。

また、モノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体作製法（「单クロー
ン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990 年； "Monoclonal
15 Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996）に従い
作製することができる。

このような抗体作製のための HRF タンパク質または HRF ペプチドは、例え
ば、HRF ポリヌクレオチドを保有する組換え発現ベクターを用いた公知のイン
20 ピトロ転写・翻訳法や、適当な宿主（大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆
虫細胞、動植物細胞等（例えばカイコなどの昆虫も含む））ベクター系（例え
ばバキュロウイルスベクター系も含む）を用いた遺伝子組換え技術によって取得
することができる。例えば、配列表配列番号 1 の HRF 遺伝子／アミノ酸配列に
基づき、HRF あるいはその一部のドメイン、HRF の一部のタンパク質あるいは
25 ポリペプチドフラグメント、HRF のアミノ酸配列に相当する一部のアミノ酸配
列を持つペプチドをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適
当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的の
HRF タンパク質あるいはその一部のドメインタンパク質、HRF の一部のタンパ
ク質あるいはポリペプチドフラグメント、HRF のアミノ酸配列に相当する一部
30 のアミノ酸配列を持つペプチドを公知の方法で精製する。また特にオリゴペプチ

ドは、固相法等の公知の方法により化学的に合成することもできる。

なお、HRF ポリヌクレオチドは各種の変異体（例えば、GenBank/XM_294045、XM_038391、XM_293291、XM_209741、5 XM_210566、XM_066706、XM_066675、XM_071321 等）が知られているが、SEQ ID:1（塩基配列）に示した HRF cDNA（または TPT-1：GenBank/NM_003295）を好ましいものとして例示する。このようなポリヌクレオチドは、それぞれ公知の方法によって容易に取得することができる。例えば、cDNA の場合には、公知の方法（Mol. Cell Biol. 2, 161-170, 1982；J. Gene 10 25, 263-269, 1983；Gene, 150, 243-250, 1994）を用いて cDNA を合成し、それぞれ公知の塩基塩基配列に基づいて作製したプローブ DNA を用いて、それぞれの cDNA を単離する方法によって取得することができる。得られた cDNA は、例えば、PCR（Polymerase Chain Reaction）法、NASBN 15（Nucleic acid sequence based amplification）法、TMA（Transcription-mediated amplification）法および SDA（Strand Displacement Amplification）法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅することができる。また、この発明によって提供されるプライマーセットを用い、ヒト細胞から単離した mRNA を錆型とする RT-PCR 法によっても必要量の各 cDNA を得るこ とができる。

20

また、特定の HRF ペプチドをコードする HRF オリゴヌクレオチドは、例えば前記のポリヌクレオチド(cDNA)を適当な制限酵素で切断することによって得ることができる。あるいは、Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; 25 Belousov (1997) Nucleic Acid Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第 4,458,066 号に記載されているような周知の化学合成技術により、in vitro において合成することができる。

- 発明(2)および(3)の抗体は必要に応じてそれをより精製された形態のものとして使用される。抗体を精製・単離する手法としては、従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオ
5 イン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して用いることができる。好ましくは、抗血清、モノクローナル抗体を含有する腹水などは、硫酸分画した後、DEAE-セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロ
テインAカラムの如きアフィニティ・カラムなどで処理し精製分離処理できる。
10 特に好ましくは抗原又は抗原断片（例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特異的に認識する部位など）を固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、プロテインAを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィーなどが挙げられる。
- 15 これら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られる Fab、Fab'、F(ab')₂といった抗体フラグメントにして使用してもよい。抗体は、既知の任意の検定法、例えば競合的結合検定、直接及び間接サンドイッチ検定、及び免疫沈降検定に使用することができる（Zola,
Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press,
20 Inc., 1987) 。

抗体を検出可能な原子団にそれぞれコンジュゲートするには、当分野で知られる任意の方法を使用することができ、例えば、David et al., Biochemistry, 13 卷, 1014-1021 頁 (1974); Pain et al, J. Immunol. Meth., 40: pp.219-231 (1981); 及び "Methods in Enzymology", Vol. 184, pp.138-163 (1990) により記載の方法が挙げられる。標識物を付与する抗体としては、IgG 画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部 Fab'を用いることができる。

抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、この発明ではそれから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使

用されるものが種々知られており、この発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、
5 例えばアミノアルキルシリルガラスなどの活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカ
ゲル、シリカーアルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエ
チレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリビニル、
ボリ酢酸ビニル、ポリカーボネート、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチ
レン-ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、ス
チレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイ
ン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コ
10 ラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、
微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの
天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポ
リウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合
して得られたもの、シリコンガムなど、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シラ
15 ンカップリング剤などで官能性基を導入してあるものが挙げられる。

担体としては、粒子、微粒子、マイクロパーティクル、メンブレン、ろ紙、ビ
ーズ、チューブ、キュベット、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレー
ト、タイターウェル、マイクロプレート、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合
20 成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは偏平な突起をつけた棒、
薄板状にした棒などの固体物質（物体）の表面などが挙げられる。

これら担体へ抗 HRF 抗体との結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮
25 合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さら
には相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことが出来る。

発明(2)および(3)の抗体には、それぞれ標識物質によって標識化された抗体も
含まれる。標識としては、酵素、酵素基質、酵素阻害物質、補欠分子類、補酵素、
30 酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光

物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、非金属元素粒子、
例えばセレンコロイドなど、放射性物質などを挙げることができる。好ましい標
識物質は、酵素、放射性同位体または蛍光色素をふくむ化学物質を使用すること
ができる。酵素は、turnover number が大であること、抗体と結合させても安
5 定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば特段の
制限はなく、通常の EIA に用いられる酵素を使用できる。酵素としては、脱水
素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシ
ル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例
えればエステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分
10 解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げることができ
る。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば
酵素的サイクリングを利用することもできる。酵素標識などは、ビオチン標識体
と酵素標識アビジン（ストレプトアビジン）に置き換えることも可能である。こ
のように、ビオチニアビジン系を使用したり、抗 HRF 抗体に対する抗体など
15 の二次的な抗体を使用するなど、当該分野で公知の感度増強法を適宜採用する
ことができる。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こう
した場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは
別々に行うことを可能にすることもできる。

20 代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダ
ーゼ、大腸菌 β -D- ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、リンゴ酸脱水
素酵素、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、グルコースオキシダーゼ、グルコ
アミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホス
ファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリフオスファターゼな
25 どが挙げられる。

これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方
法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知
の物質を使用することができ、4-メチルウンベリフェリルfosfate など
30 のウンベリフェロン誘導体、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノ

ール誘導体などが挙げられ、例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジシンを、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、o-フェニレンジア

- 5 ミン(OPD)、テトラメチルベンジシン(TMB)、5-アミノサリチル酸、3,3-ジアミノベンジシンテトラヒドロクロライド(DAB)、3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)、チラミン、ルミノール、ルシゲニルシフェリン及びその誘導体、
Pholad luciferinなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、
ルミジエンPPD、(4-メチル)ウンベリフェリル-リン酸、p-ニトロフェノール-
10 リン酸、フェノール-リン酸、プロモクロロインドリルリン酸(BCIP)、
AMPAK™(DAKO)、AmpliQ™(DAKO)などとアルカリフォスファターゼ、4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシドといったウンベリフェリルガラクトシド、o-ニトロフェノール-β-D-ガラクトシドといったニトロフェニルガラクトシドなどとβ-D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼ、
15 ABTSなどとグルコースオキシダーゼなどの酵素試薬の組合せも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リポ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるもののが使用できる。

- 20 放射性同位体としては、³²P、¹²⁵I、¹⁴C、³⁵S、³H等の通常のRIAで用いられているものを使用することができる。蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(RITC)、テトラメチルローダミンイソチオシアネートアイソマーR(TRITC)などのローダミン誘導体、7-アミノ-4-クマリン-3-酢酸、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。蛍光色素としては、通常の蛍光抗体法に用いられるものを使用することができる。発色、螢光などを含めた生成する信号などを検知するには、視覚によることもできるが、
25
30

公知の装置を使用することもでき、例えば蛍光光度計、プレートリーダーなども使用できる。また、放射性同位体（アイソトープ）などの出す信号を検知するには、公知の装置を使用することもでき、例えばガンマーカウンター、シンチレーションなども使用することができる。

5

抗体を標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。縮合剤としては、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N,N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスジアゾベンジジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル4-(1-マレイミドフェニル)ブチレート、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド(EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシンイミジル-S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

25

このような抗体を用いた診断方法における一つの態様は、抗体とHRFタンパク質との結合を液相系において検出する方法である。例えば、発明(2)の抗体を標識化した標識化抗体と生体試料とを接触させて標識化抗体とHRFタンパク質を結合させ、この結合体を分離する。分離は、HRFタンパク質+標識化抗体の結合体を公知の分離手段（クロマト法、固相法等）によって分離する方法等によ

って行うことができる。また公知のウエスタンプロット法に準じた方法を採用することもできる。標識シグナルの測定は、標識として酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から

- 5 抗体量が算出される。放射性同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。また、蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

10 液相系での診断の別 の方法は、発明(2)の抗体（一次抗体）と生体試料とを接觸させて一次抗体と HRF タンパク質を結合させ、この結合体に標識化した発明(2)の抗体（二次抗体）を結合させ、この三者の結合体における標識シグナルを検出する。あるいは、さらにシグナルを増強させるためには、非標識の二次抗体を先ず抗体+抗原ペプチド結合体に結合させ、この二次抗体に標識物質を結合させるようにしてもよい。このような二次抗体への標識物質の結合は、例えば二次抗体をビオチン化し、標識物質をアビジン化しておくことによって行うことができる。あるいは、二次抗体の一部領域（例えば、Fc 領域）を認識する抗体（三次抗体）を標識し、この三次抗体を二次抗体に結合させるようにしてもよい。なお、一次抗体と二次抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。液相からの結合体の分離やシグナルの検出は前記と同様とすることができる。また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、発明(10)の診断キットが提供される。

25 抗体を用いた別の診断法は、抗体と HRF タンパク質との結合を固相系において試験する方法である。この固相系における方法は、極微量の HRF タンパク質の検出と操作の簡便化のため好ましい方法である。すなわちこの固相系の方法は、発明(2)の抗体を樹脂プレートまたはメンブレン等に固定化し、この固定化抗体に HRF タンパク質を結合させ、非結合タンパク質を洗浄除去した後、プレート30 上に残った抗体+HRF タンパク質結合体に発明(3)の抗体を標識化した標識化抗

体を結合させて、この標識化抗体のシグナルを検出する方法である。この方法は、いわゆる「サンドイッチ法」と呼ばれる方法であり、マーカーとして酵素を用いる場合には、「ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)」として広く用いられている方法である。2種類の抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、いずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。
5

この発明での診断はまた、免疫染色、例えば組織あるいは細胞染色、免疫電子顕微鏡、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、放射免疫測定法(RIA)、蛍光免疫測定法(FIA)、ルミネッセント免疫測定法(LIA)、酵素免疫測定法(EIA)、ELISAなどを用いることができ、B-F分離を行ってもよいし、あるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくは RIA、EIA、FIA、LIA であり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。サンドイッチ型アッセイには、同時サンドイッチ型アッセイ、フ15
15 ォワード (forward)サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどが含まれてよい。

この出願の発明における HRF タンパク質の測定系としては、例えば組織に対しては免疫染色、免疫電子顕微鏡などの蛋白測定系、組織抽出物、血液、体液等に対しては EIA、RIA、FIA、LIA、ウエスタンプロットティングなどの蛋白測定系。
20

EIA の測定系において、例えば競合法では、抗 HRF 抗体を固相化抗体として使用し、標識抗原及び非標識抗原（抗原としては、HRF タンパク質あるいはそのフラグメントペプチドなどが挙げられる）を使用し、また非競合法で、例えばサンドイッチ法では、固相化抗 HRF 抗体や標識抗 HRF 抗体を利用できる他、抗 HRF 抗体を直接標識したり、固相化せずに、抗 HRF 抗体に対する抗体を標識したり、固相化して行うこともできる。感度増幅法としては、例えば、非酵素標識一次抗体との組み合わせでは、高分子ポリマーと酵素と一次抗体を利用する
30
30 もの（Envision 試薬を応用したもの；Enhanced polymer one-step staining

(EPOS))が挙げられ、非酵素標識二次抗体との組合せでは、例えば
PAP(peroxidase-antiperoxidase)法などの酵素と抗酵素抗体複合体の組合せ、
SABC(avidin-biotinylated peroxidase complex)法などのビオチン標識二次抗体とビオチン標識酵素－アビジン複合体の組合せ、ABC(streptavidin-biotin
complex)法、LSAB(labeled streptavidin-biotin)法などのビオチン標識二次抗体とビオチン標識酵素－ストレプトアビジン複合体の組合せ、CSA(catalyzed signal amplification)法などのSABCとビオチン標識タイラマイドと酵素標識ストレプトアビジンの組合せ、高分子ポリマーで二次抗体と酵素を標識してあるものなどが挙げられる。

10

これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参考することができる〔例えば、入江 寛編、「ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和49年発行；入江 寛編、「続ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和54年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」、医学書院、昭和53年発行；石川栄治ら編、15 「酵素免疫測定法」（第2版）、医学書院、昭和57年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」（第3版）、医学書院、昭和62年発行；H. V. Vunakis et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B),
20 Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone et al.
25 (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Immunochemical Techniques, Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York
30 (1986); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178

(Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular

5 Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991)等の記載、あるいはそこで引用された文献中にある記載]。

この出願は、このような固相系において細胞抽出物や血液中のタンパク質量を
10 測定する診断方法として発明(7)として提供する。すなわち、この発明(7)は、少
なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料を前記発明(2)の抗体を固定化した担体と接触する工程；
 - (b) 工程(a)で生体試料と接触させた担体を洗浄する工程；
 - (c) 工程(b)で洗浄した担体に標識化した前記発明(3)の抗体を接触させる工程；
 - 15 (d) 担体上の結合標識あるいは遊離標識を測定する工程；
 - (e) 工程(d)で測定された標識量を HRF タンパク質量の指標とし、正常生体試料
の結果と比較する工程；および
 - (f) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF タンパク質量を、子宮内膜症関連
疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、
- 20 を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法である。

また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、
発明(11)の診断キットが提供される。

25 さらにこの出願は、固相系において組織または細胞の HRF タンパク質量を測
定する方法として、発明(8)の診断方法を提供する。すなわちこの方法は、少
なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料を組織固定化処理に付す工程；
- (b) 工程(a)で調製された組織固定化標本を切片とする工程；
- 30 (c) 工程(b)で得られた切片化組織を前記発明(2)の抗体による免疫組織染色に付

す工程；

- (d) 工程(c)による免疫組織染色の程度を HRF タンパク質量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
(e) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF タンパク質存在量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、
5 を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法である。

この発明(8)の方法においては、抗体による免疫組織染色を 1 種類の抗体でおこなってもよく、あるいは 2 種類の抗体（例えば発明(2)の抗体と、標識化抗 Ig 10 抗体等）で行ってもよい。

このような発明(8)等の診断を効率的に行うための手段として発明(9)の診断キットが提供される。

15 発明(9)～(11)の診断キットは、前記の各診断方法を行うための試薬キットである。このようなキットは、被検成分の種類に応じて各種のものが市販されており、この発明の診断キットも、この発明によって提供される抗体および／または標識化抗体を用いることを除き、公知公用のキットに用いられている各要素によって構成することができる。

20 なお、この出願によって提供される診断方法は、前記の各種方法の 2 以上を組み合わせて行うことができ、あるいは例えば HRF タンパク質をコードする遺伝子の発現量を公知の手段（例えばノーザンプロッティング法、RT-PCR 法、DNA マイクロアレイ法等）で測定する方法と併用することもできる。

25 発明(12)は、HRF タンパク質を認識し、かつ HRF タンパク質の活性を中和する抗体であり、発明(13)はこの抗体を含有する子宮内膜症関連疾患の治療薬である。また発明(14)は、前記の抗体または治療薬を体内に投与することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の治療方法である。

発明(12)の抗体は、HRF タンパク質の活性を中和する（すなわち HRF タンパク質の活性を阻害または抑制する）抗体であり、子宮内膜症関連疾患の治療に有効である。後記実施例にも示したように、HRF タンパク質を過剰に產生する細胞は *in vivo* において活発に増殖することから、細胞内における HRF タンパク 5 の過剰活性が子宮内膜組織の移植や増殖の原因となっていると考えられる。そこでこの HRF タンパク質の活性を中和することによって、子宮内膜症関連疾患の治療、または少なくともその進行、悪化を停止もしくは抑制することが可能となる。

10 HRF を強制発現させた細胞をマウスなどの動物の体内、例えば腹腔内に注入した結果、子宮内膜症様病変が腹腔内に惹起されることから、上記 HRF を中和できる抗体を利用することで HRF の影響を抑制するなどして治療に利用できることは明らかである。

15 発明(12)の抗体は、好ましくはモノクローナル抗体であり、さらに好ましくはヒト化モノクローナル抗体である。非ヒト抗体をヒト化する方法は公知であり、例えば、齧歯動物由来の抗体の相補性決定領域 (CDR) をヒト抗体の該当する配列で置換することによって作成することができる（例えば、Jones et al., Nature, 1986, 321:522-525 ; Riechmann et al., Nature, 1988, 332:323- 20 327 ; Verhoeyen et al., Science, 1988, 239:1534-1536）。このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインと、1 または複数個のアミノ酸残基が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体（例えば、米国特許第 4,816,567 号）である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には幾つかの CDR 残基および場合によっては幾つかの FR 残基が齧歯類抗体の対応する部位からの残基によって置換された抗体である。また、ヒト化抗体は、これ以外にも、幾つかの公知の方法（例えば、Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381 ; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581 ; Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. p.77 ; Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147(1) : 86-95）に従って作成することができる。あるいはまた、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニッ 25 30

ク動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたマウスに導入することにより產生することができる（例えば、米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、Marks et al., 1992, 5 Bio/Technology 10, 779-783; Lonberg et al., 1994, Nature, 368:856-859; Morrison, 1994, Nature, 368 : 812-13; Fishwild et al., 1996, Nature Biotechnology, 14 : 845-51; Neuberger, 1996, Nature Biotechnology, 14 : 826; Lonberg and Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol., 13 : 65-93）。

- 10 発明(13)の薬剤は、前記抗体を含むものとして製剤化される。すなわち、所望される程度の純度を持つ抗体を、親油性製剤または水性溶液の形態で、任意の製薬上許容される担体、賦形剤または安定化剤と混合することにより調製され保存される (Remington's Pharmaceutical Science 18th edition 1990)。許容される担体、賦形剤、または安定化剤は、用いられる用量および濃度において患者に非毒性であることを条件として、剤形や投与経路に応じて適宜に選択することができる。例えば、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチルまたは15 ベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサンノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロイドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む单糖類、二糖類、および他の炭水化物 EDTA 等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）またはトゥイーン 25 (TWEEN)（商品名）、フルロニクス(PLURONICS)（商品名）、およびポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤等である。
- 30

この発明の薬剤はまた、細胞毒性薬、サイトカインまたは成長阻害剤等の活性成分を含有するものであってもよい。これらの成分は、例えばコアセルベーション技術により、または界面重合により調製されたマイクロカプセル [例えば、
5 各々ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル] 中、またはコロイド状薬物送達系
 (例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子およびナノカプセル) 中に包含されてもよい (Remington's Pharmaceutical Science 18th edition, 1990 を参照)。

10

さらに、体内に投与される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクス (例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形状) である。除放性マトリクスの
15 例は、ポリエステルヒドロゲル (例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール))、ポリアクチド (米国特許第 3,773,919 号)、L-グルタミン酸および γ -エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名) (乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球) などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸等である。また、エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を 100 日に渡って放出することができる。

発明(14)の治療方法は、前記の抗体または薬剤を生体内に投与することによつ
25 て実施することができる。例えば、薬剤を子宮内膜に局所投与するか、あるいは静脈を介して全身投与する方法等である。抗体の投与量は、患者の体重、症状等に応じて、1 日当たり約 $100 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重～ $10\text{mg}/\text{Kg}$ 体重程度とすることができる。

30

実施例

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例 1

1. 材料と方法

10

1-1. 組織試料

RNA 調製のために、18 例の患者から以下の試料を得た。1)子宮内膜症移植片 ($n=21$) 、2)子宮内膜症患者に由来する正所性子宮内膜組織（搔爬による； $n=4$ ） 、3) 子宮内膜症を持たない患者に由来する正常子宮内膜組織 ($n=6$) 。

15 いくつかの試料は一個人の異なる部位から得た。試料は液体窒素中で凍結し、-80°Cで貯蔵して RNA 調製に備えた。子宮内膜症移植片は卵巣から得た。RNA 調製用の正常子宮内膜組織と、正常に増殖および分泌を行う子宮内膜組織をホルマリン固定、パラフィン包埋した試料は、平滑筋腫または子宮脱の患者から取得した。病理標本は組織学的試験により段階づけを行った結果、それらは子宮内膜症の第 III から IV 段階にわたっていた (t-ASRM : revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis [改訂版米国生殖医学学会子宮内膜症分類]、1996)。また、この研究の女性被験者は子宮内膜の過形成や腫瘍形成を示さず、手術前に抗炎症剤やホルモン剤の投与を受けていなかった。手術前に書面の同意を得たが、これは東京医科大学病院の人体調査に関する施設内監査委員会により承認されたプロトコルに従った。

1-2. ノーザンプロット分析

ノーザンプロットは文献 (Oikawa K. et al. Cancer Res. 2001, 61(15):5707-9) の記載により実施した。HRF プローブは文献 (Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3):984-7) の記載に従って

調製した。ヒト β アクチン cDNA 対照プローブ (CLONTECH Laboratories, Inc.) をスタンダードとした。

1-3. サザンプロット分析を用いた RT-PCR

文献 (Kubota M. et al. Am. J. Pathol. 1997, 151(3):735-44) の記載に従い、オリゴヌクレオチド dT プライマーを用いてトータル RNA から第 1 鎖 cDNA を合成した。次に、得られた第 1 鎖 cDNA 溶液 $2\mu l$ (1x) および $10\mu l$ (5x) をテンプレートとして用い、PCR を行った。以下の 4 種類のプライマーを添加した後、初期変性を 95°C で 2 分間、(95°C で 0.5 分、 65°C で 0.5 分、 72°C で 1 分) $\times 22$ サイクルの条件で CYP1A1 と β アクチンの cDNA 断片の PCR 増幅した。

CYP1A1 増幅用プライマー : 5'-ccacaaccaccaagaactgcttag-3' (SEQ ID: 3)
5'-gaaggggacgaaggaagagtg-3' (SEQ ID: 4)

β アクチン増幅用プライマー : 5'-ggaaaatcgtgcgtgacgttaag-3' (SEQ ID: 5)
5'-tgtgttggcgtacaggctttg-3' (SEQ ID: 6)

増幅産物をアガロースゲル上の電気泳動により分画した後、プロッティングとハイブリダイゼーションを行った。CYP1A1 cDNA プローブは、上述のプライマー対を用いた逆転写 PCR により得た。ヒト β アクチン cDNA プローブ (CLONTECH) を対照として用いた。Rediprime II random prime labeling system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて、これらの cDNA プローブを ^{32}P により標識した。

25 1-4. 抗体調製と免疫組織化学法

ヒト HRF に由来するオリゴペプチド (GKLEEQRPERVKPFMT : SEQ ID: 2 の 101-116) に対するペプチド抗体を、ウサギを用いた標準法により行った作製し、HRF-GKL と命名した。免疫組織化学的分析は、脱パラフィン化した切片を抗 HRF 抗体、HRF-TPY (Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3):984-7) および HRF-GKL (1:100 に稀釀) または抗

ヒト CD68 抗体（1:100 に稀釀；Dako 社）の混合液の存在下で一夜インキュベートした。抗 HRF 染色用には、脱パラフィン化した切片を圧力滅菌器を用いて熱誘導性の抗原回復に供した。LSABC（Dako）を用いて検出を行ったが、ここでは 3,3'-ジアミノベンチジンを色素体として使用した。ヘマトキシリソニンを用いて逆染色を行った。

1-5. ウエスタンプロット分析

ウエスタンプロット分析は文献（Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3):984-7）の記載に従って行った。膜のプローブ処理は抗 HRF (HRF-GKL または HRF-TPY) 抗体を用い、1:2000 の稀釀比で行った。シグナル検出は ECL plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて行った。

1-6. 細胞培養とレトロウイルス感染

NIH3T3 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) より取得した。細胞は、37℃ 条件で 10% FBS を添加した DMEM (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc.) 中、5% CO₂ 環境下に維持した。全長 ORF を含むマウス HRF cDNA を以下のプライマーを用いて PCR 増幅した。

5'-ttggatccatgatcatctaccggacctg-3' (SEQ ID: 7)

5'-ttgaattcttaacatttctccatctctaa-3' (SEQ ID: 8)

得られた cDNA 断片を BamHI および EcoRI で消化し、レトロウイルス発現ベクター MSCV-puro (CLONTECH) の BglII-EcoRI 部位にクローニングした。組み替えレトロウイルスの調製と感染のプロトコルは文献 (Kuroda > et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96(9):5025-30) の記載に従った。感染の 24 時間後、1 μg/ml ピューロマイシン (CLONTECH) を用いて 2 週間にわたり感染細胞を選別した。

1-7. 動物と処置

5 × 10⁵ 個の細胞の部分標本を、6 週齢のメス BALB/C ヌードマウスの腹腔内に注射して移植アッセイを行った。2 週間後に動物を屠殺し、移植片コロニー数

を測定した。

2. 結果

2-1. 子宮内膜症における TCDD 誘導性遺伝子 HRF の発現パターン

5 ノーザンプロット分析により、子宮内膜症時の HRF 発現パターンを決定した。その結果、5 例中 3 例の患者から得た子宮内膜症移植片組織中に高レベルの HRF 発現が認められた（図 1A および 1B）。ヒトのチトクローム p450 遺伝子スーパーファミリーの一部（例えば CYP1A1、CYP1A2 および CYP1B1）はジオキシンにより誘導されるため、CYP1A1 の誘導はジオキシン依存性の遺伝子 10 発現調節に対する基本的な標的になる。このためジオキシン曝露と HRF 発現の関連を調べるために、ここではサザン分析による RT-PCR を用いて CYP1A1 発現を調査した（Trifa Y. et al. J. Biol. Chem. 1998, 273(7):3980-5; Oikawa K. et al. Gene 2000, 261(2):221-8）。その結果、CYP1A1 は必ずしも高 HRF 発現を示す全例において誘導されている訳ではなかった（図 1A および 1B）。 15 このため、いくつかのケースでは HRF 発現が TCDD により誘導されている可能性はあるにも関わらず、子宮内膜症移植片における HRF は TCDD 曝露とは無関係に誘導されていることが確認された。

2-2. 子宮内膜症移植片における HRF 過剰発現

20 子宮内膜症を追加発症した患者の子宮内膜症移植片において、HRF が過剰発現していることが確認された。すなわち、7 例の子宮内膜症患者について、ノーザンプロット分析を行った（図 2A）。正常な子宮内膜組織および子宮内膜症患者の正所性の子宮内膜と比較すると、子宮内膜症移植片においては高度な HRF 発現が観察された（図 2B）。

25

2-3. 正常子宮内膜と子宮内膜症移植片における HRF の免疫組織化学

HRF を発現する子宮内膜細胞のタイプを、抗 HRF ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学により決定した。その結果、HRF が子宮内膜腺と正常組織の間質細胞に共に存在することが同定されたが、宮内膜腺は間質細胞より強い発現を 30 示した（図 3A および 3B）。分泌と増殖フェーズの間における発現パターンの

顕著な変化はなかった。さらに、子宮内膜症移植片における HRF 発現も調査した。その結果、卵巣の子宮内膜症移植片の間質および上皮成分の両方に HRF が存在していた（図 3C と 3E）。正常な子宮内膜の間質細胞での HRF 発現は弱いのに対して、卵巣の子宮内膜症移植片では子宮内膜腺と間質細胞はいずれも同様 5 な高レベルの HRF 発現を示した。これらの HRF に対する特異的なシグナルは、免疫前血清を対照として用いた場合には観察されなかった（データ示さず）。しかしながら、子宮内膜症移植片における HRF 誘導のメカニズムは依然として不明である。M-CSF による活性化段階においてマクロファージが HRF を誘導することを示す報告（Teshima S. et al. J. Immunol. 1998, 161(11):6353-66）
10 と一致するように、子宮内膜症移植片においては CD68 陽性のマクロファージ の関与が観察されている（Hornung D. et al. Am. J. Pathol. 2001, 158(6):1949-54）。従って、移植片の連続切片に対する CD68 染色を利用して、 HRF 過剰発現領域内部における CD68 陽性のマクロファージを同定した（図 3F）。ヘマトキシリソ-エオジンを用いて染色した対照切片は、子宮内膜症移植
15 片の全体的な形態を示している。これらの結果から、子宮内膜症移植片における HRF 产生にはマクロファージが寄与しているであろうと考えられる。

2-4. NIH3T3 細胞の腹腔内移植に対する HRF の効果

HRF 発現増加による生理学的な影響について調査した。子宮内膜症の原因は 20 未だに不明である（Klininckx R.P. et al. Gynecol Obstet Invest. 1999, 47 Suppl 1:3-9, discussion 9-10; van der Linden P.J.Q. Front Biosci. 1997, 2:c48-52）。主要な仮説に従うならば、子宮内膜症の発症は、卵管逆流により 腹腔に達した（逆行性月経）子宮内膜組織の移植および増殖による。ここではこの移植に対して HRF が及ぼす影響を調査した。最初に、HRF を過剰発現する
25 NIH3T3 細胞の安定形質移入体を作製した。HRF 発現用のレトロウイルスベクター（pMSCV-HRF）を感染後に、高度な HRF 発現が確認された（図 4A）。 次にこれらの細胞（pMSCV-HRF-3T3 細胞）をヌードマウスの腹腔内に注射した。pMSCV-HRF-3T3 細胞は、対照ベクター（pMSC-3T3）を感染させた細胞 と比較して高い移植能を有していた（図 4B）。これらのデータから、HRF は免
30 疫学的機能不全においてのみならず、子宮内膜症移植片の初期発達にも重要な役

割を果たしていることが示唆された。

実施例 2

5 ポリクローナル抗体の作製

抗 HRF 抗体を含有する抗血清の調製し、この血清から抗 HRF 抗体を精製した。

- 感作抗原としてヒト HRF タンパク質(配列番号 2)のうちの 101-116 位のペプチドを選択して合成した。合成したペプチドは HLA をキャリアーとしてそれに結合させ、次に KLH と混合した(ペプチド 50 μg に対して 50 μg の KLH)。こうして得られた抗原液をフロイント完全アジュバントに混合し、感作抗原を有する溶液を調製した。この溶液を、体重 3 ~ 4 kg のウサギ (SPF Japanese White Rabbit) に対して 2 週間毎に 1 ml の量で皮下注射(5 回)した。
- 15 次に、5 回目の皮下注射の後、1 週間後に兎より採血し、血清を調製した。得られた血清に含まれる抗体が HRF タンパク質を特異的に認識することを確認し、これを抗 HRF 抗体を含む抗血清とした。

ELISA 法により抗血清が抗 HRF 抗体 (HRF-GKL) であることを確認した。

- まず、20mM 炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈した抗原ポリペプチドでポリスチレン製 96 穴プレートをコートし(100ng/ウェル)、次に 0.05% Tween20 含有 PBS を用いて洗浄して未吸着のペプチドを除去した。各ウェルに免疫兎より採血して得られた血清を添加し、室温で約 1 時間静置する。洗浄後、2 次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ免疫グロブリンを加え、さらに室温で約 1 時間静置する。洗浄後、基質である過酸化水素と 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を加え発色させる。各ウェルに 2N 硫酸を加え発色反応を停止し、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機を用いて 450nm の吸光度で測定する。比較として、免疫前に採血しておいた血清と比較して、確かに血清に含まれる抗体が HRF タンパク質を特異的に認識することを確認。上記操作は、組換えタンパク質抗原を使用して行うことも可能である。

- 30 得られた抗 HRF 抗体を含む抗血清は、NIH3T3 の total cell lysate 10 μg を

14%の SDS-PAGE にかけ、ウェスタンプロットにて 2000 倍に希釈した抗血清で検定してシングルバンドを与えることでその純度を確認している。この抗体は、マウスとヒト細胞で同じサイズの蛋白質を検出するものであった。

精製抗 HRF 抗体の調製は、上記 HRF タンパク質の 101-116 位のペプチドをアフィゲル（バイオラッド社製）に固定化したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって実施できる。精製 HRF ペプチドをアフィゲル-10（バイオラッド社製）と混合し、4℃で 1 晩反応させた後、アフィゲルを 20 mM リン酸緩衝液-生理食塩水(PBS)で十分に洗浄し、アフィゲルの未反応官能基は 100 mM のモノエタノールアミンを含む PBS 中で、1 晩ブロッキングを行ない、最終的に PBS で再度洗浄して、ペプチド固定化カラムを調製する。この固定化カラムに抗 HRF 抗体を含むウサギ血清を添加し、PBS で十分に洗浄した後、吸着した抗 HRF 抗体を 20 mM グリシン-塩酸緩衝液(pH 4.0)で溶出する。溶出した抗 HRF 抗体溶液は直ちに 200 mM トリス-塩酸緩衝液で中和し、PBS で 1 晚透析した後、-80℃で凍結保存する。

15

実施例 3 サンドイッチ EIA

下記の方法に従えば、実施例 2 で調製した抗 HRF 抗体及び公知の抗 HRF 抗体から少なくとも 1 種を選択し、抗 HRF 抗体の 2 種の適当な組み合わせによってヒト HRF タンパク質を特異的に検出・測定するサンドイッチ EIA 系が構成できる。EIA 系は 1 ステップ法、2 ステップ法のいずれも可能であり、標識抗体は Fab'-HRP に限定されない。各反応緩衝液の組成や反応条件は測定の目的に応じて、短縮、延長など調整できる。また、標準品となるヒト HRF は、組織培養上清、細胞培養上清または実施例 1 記載あるいはそれ以外の方法で発現した組換え体から精製することができる。精製にはイオン交換、ゲルろ過、抗ヒト HRF 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーまたそれ以外の各種アフィニティークロマトグラフィーの組み合わせによって達成される。

30

(a) 標識抗体の調製

抗 HRF 抗体 (HRF-GKL) を 0.1M NaCl を含む 0.1M 酢酸緩衝液、pH4.2 に抗体量の 2%(W/W) のペプシンを加え、37°C、24 時間消化する。消化物に 3M Tris-HCl、pH7.5 を添加し、反応を停止する。0.1M リン酸緩衝液、pH7.0 で 5 平衡化したウルトロゲル AcA54 カラムによるゲルろ過で $F(ab')_2$ 画分を分取する。この $F(ab')_2$ 画分に最終濃度 0.01M となるようにシステアミン塩酸塩を添加し、37°C、1.5 時間還元し、5mM EDTA 含有 0.1M リン酸緩衝液、pH6.0 で平衡化したウルトロゲル AcA54 カラムによるゲルろ過で Fab' 画分を分取する。

上記の操作とは別に HRP を 0.1M リン酸緩衝液、pH7.0 に溶解、HRP の 25 10 倍モル量の EMCS を DMF 溶液として加え、30°C、30 分間反応させる。これを 0.1M リン酸緩衝液、pH6.0 で平衡化した NICK-5 カラム (Pharmacia) でゲルろ過しマレイミド標識 HRP 画分を分取する。

Fab' 画分とマレイミド標識 HRP を等モルとなるように両画分を混合し、4°C、20 時間反応させた後、 Fab' の 10 倍モル量の N-エチルマレイミドで未反応のチ 15 オール基をブロックする。これを 0.1M リン酸緩衝液、pH6.5 で平衡化したウルトロゲル AcA54 カラムでゲルろ過し、 Fab' -HRP 標識抗体を分取する。これに 0.1% BSA および 0.001% クロルヘキシジンを添加して 4°C で保存する。他の抗ヒト HRF 抗体を用いても同様に処理できる。

20 (b) 抗体結合担体の調製

抗 HRF 抗体(HRF-TPY)を 0.1M リン酸緩衝液、pH7.5 に溶解し、50 μg/mL の濃度に調製する。この抗体溶液を 96 穴マイクロプレートにウエルあたり 100 μL ずつ加え、4°C、18 時間静置する。抗体溶液を除去し、生理食塩液で 1 回、0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂ 含有 Tris-HCl 緩衝液、pH8.0 で 25 3 回洗浄後、1% BSA、0.1M NaCl、5mM CaCl₂ 含有 Tris-HCl 緩衝液、pH8.0 を加えブロッキングする。他の抗ヒト HRF 抗体を用いても同様に処理でき、固相抗体を調製できる。

(c) ステップサンドイッチ EIA 法

30 精製したヒト HRF 画分を標準抗原としてヒト HRF 定量用標準曲線を作成す

る。1% BSA、0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有 Tris-HCl 緩衝液、pH8.0 で段階希釈した標準ヒト HRF を分注、それぞれに 1% BSA、0.05% Tween 20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有 Tris-HCl 緩衝液、pH8.0 で調製した標識抗体 Fab'-HRP を添加し十分混和する。調製した抗体結合マイクロプレートを 0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有 Tris-HCl 緩衝液、pH8.0 で 3 回洗浄し、標準抗原と標識抗体混合液を添加する。室温で 1 時間反応した後 0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有 Tris-HCl 緩衝液、pH8.0 で 3 回洗浄する。次に、6%ジメチルホルムアミド、0.005%過酸化水素含有 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH5.5)に溶解した 0.01% 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンをウエルに添加し、室温で 20 分間反応後、2N 硫酸を添加し反応を停止する。この反応混液の 450 nm をマイクロプレートリーダーを用いて測定し、標準曲線を求める。

測定検体は、ヒトに由来する体液成分、各種ヒト組織の抽出液、ヒト由来あるいは組換え体など各種培養細胞の細胞抽出液、培養上清などから調製される。それぞれの測定検体は、標準ヒト HRF に代えて上記の 1 ステップサンドイッチ EIA に供し、標準ヒト HRF と同時に反応を進行させる。測定検体から得られた吸光度を標準曲線にあてはめ、測定検体に含まれるヒト HRF の量を算出する。

上記の他、市販の抗ヒト HRF 抗体を使用し、瓜谷郁三他編、「生物化学実験法 27、石川栄治著、酵素標識法」、株式会社学会出版センター(1991 年 6 月 20 日発行)及び日本生化学会編、「統生化学実験講座 5、免疫生化学研究法」、p107-112、東京化学同人、1986 年 3 月 14 日発行に記載の方法(これら文献において引用されている文献に記載の方法も含む)に従って、酵素標識抗体を調製でき、さらにそれを測定に使用できる。

25

実施例 4 ウエスタンプロッティング

ヒト HRF を発現する細胞又は組織の培養上清及び精製組換えヒト HRF を還元条件下、10-15% SDS-PAGE で分離後、polyvinylidene difluoride(PVDF)膜

- (MILLIPORE)に転写した。続いて 5% BSA 又は 5%スキムミルクおよび 0.05%アジ化ナトリウム含有 TBS (プロッキングバッファー) を用いて室温で 0.5-1 時間プロッキングした後、HRF-GKL で処理し、25℃で 6 時間以下の時間 インキュベートする。それぞれの膜を 0.1% Tween 20 含有 TBS(0.05%アジ化
5 ナトリウム含有)で 4 回洗浄し、結合した抗体をプロッキングバッファーで 1:1,000 に希釈した HRP 結合抗ウサギムノグロブリン抗体と 25℃、1 時間反応させる。反応後、膜を 0.1% Tween 20 含有 TBS(0.05%アジ化ナトリウム含有)で 4 回洗浄し、結合した抗体を Enhanced chemiluminescence(ECL, Amersham Pharmacia)により検出する。
- 10 上記の他、HRF-TPY を使用し、口野嘉幸他編、「遺伝子・タンパク質、実験操作 プロッティング法」、p212-241、株式会社ソフトサイエンス社、昭和 62 年 11 月 10 日発行に記載の方法（これら文献において引用されている文献に記載の方法も含む）に従って、ウエスタンプロッティングを実施できる。

15

実施例 5 モノクロナール抗体の作製

- 患者から採取されたヒト子宮内膜症病変部組織中の細胞から調製したトータル
20 RNA を用いた TR-PCR 法により、ヒト全長 HRF cDNA を単離した。PCR プラ
イマーは、ヒト HRF cDNA 全長配列 (SEQ ID:1) に基づき、以下のオリゴヌ
クレオチドを用いた。
- 5' primer (Bgl II)gcgcagatctATGATTATCTACCGGGAC (SEQ ID:9)
3' primer (Eco RI)ggccgaattcAGATCCAAAATAATTGCC (SEQ ID:10)
- 25 その後、得られた PCR 産物をヒトバキュロウイルスペクター pYNG HisA に
クローニングし、カイコに感染させその後、カイコ体液よりヒト HRF タンパク
質を抽出した。その後さらにニッケルカラムを用いヒスチジン Tag によってタ
ンパク質を精製した。その後精製タンパク質 100 μg を 6 週齢の Balb/C マウス
雌に 3 回にわたり免疫した後、角径リンパ節を切離し、マウスミエローマ細胞
30 P3U1 と融合させて、ハイブリドーマを得た。HRF 抗体を產生するハイブリド

一マ細胞は 2 回の限界希釈を行い、最終的にハイブリドーマ HRF25、HRF26、HRF28 を得た。ハイブリドーマのスクリーニングは ELISA 法で行なった。具体的には、 $1 \mu\text{g/ml}$ の抗原（バキュロウイルスによって作成した HRF タンパク質）を ERISA プレート 3912（ファルコン）に吸着させ、ハイブリドーマ上清 5 を反応させ、さらに第二次抗体として Goat-antiMouseIgG (Zymed 81-6522) を反応させた。基質として ALP ローゼ（シノテスト）を加え、A660nm の吸光度を測定した。その結果、クローン No. 4、18、25、26、28、46、51、54、55、56 を得た。吸光度測定の結果を表 1 に示す。

10

表 1

クローン No.	OD
4	0.15
18	0.55
25	0.08
26	0.57
28	0.29
46	0.11
51	0.56
54	0.74
55	0.43
56	0.86

さらにこれらの培養上清を用いウェスタンプロットを行なった。具体的には、HRF の発現が確認されている BJAB から total タンパク質を抽出し、Laemmili の方法に従って SDS-PAGE を行ない、ニトロセルロースメンブレンにプロッティングを行なった。その後、一次抗体として 5 倍希釈したハイブリドーマ上清 15 を反応させ、検討した。その結果、クローン No.25 (HRF25)、26 (HRF26)、28 (HRF28) が HRF タンパク質を単一のバンドとして検出することが確認された。なお、この 3 つの抗体は IgG 抗体である。

また以上の結果は、抗 HRF 抗体が非常に特異的にヒト HRF を認識すること 20 を示すものである。

実施例 1 の 2-4 における HRF 強制発現細胞である NIH3T3 細胞を使用し、上記で得たモノクローナル抗体の活性を *in vivo* ならびに *in vitro* でスクリーニン

グすることができる。活性を確認された抗体は、子宮内膜症診断薬・治療薬として有望と判断される。

5

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、子宮内膜症関連疾患およびそのリスクを簡便かつ確実に診断する方法と、そのための材料が提供される。これによって、子宮内膜症関連疾患の早期の発見、より適切な治療法の選択、再
10 発の防止等が可能となる。

請求の範囲

1. 被験者の生体試料におけるヒスタミン放出因子（HRF タンパク質）の存在量を測定し、HRF タンパク質量を正常生体試料のそれと比較し、正常生体試料
5 と比較して有意に高い HRF タンパク質量を示す被験者を、子宮内膜症関連疾患の患者またはそのハイリスク者と判定することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。
2. HRF タンパク質を認識する抗体。
10
3. 請求項 2 の抗体とは異なるエピトープと結合する抗体。
4. 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列の 90～130 位から選択された連続した 5～20 個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた請求項
15 2 または 3 の抗体。
5. 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列の 1～95 位から選択された連続した 5～20 個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた請求項 2 または 3 の抗体。
20
6. 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列の 115～172 位から選択された連続した 5～20 個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた請求項 2 または 3 の抗体。
- 25 7. 少なくとも以下の工程：
 - (a) 被験者の生体試料を請求項 2 の抗体を固定化した担体と接触する工程；
 - (b) 工程(a)で生体試料と接触させた担体を洗浄する工程；
 - (c) 工程(b)で洗浄した担体に標識化した請求項 3 の抗体を接触させる工程；
 - (d) 担体上の結合標識あるいは遊離標識を測定する工程；
 - 30 (e) 工程(d)で測定された標識量を HRF タンパク質量の指標とし、正常生体試料

の結果と比較する工程；および

- (f) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF タンパク質量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、
を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

5

8. 少なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料を組織固定化処理に付す工程；
(b) 工程(a)で調製された組織固定化標本を切片とする工程；
(c) 工程(b)で得られた切片化組織を請求項 2 の抗体による免疫組織染色に付す
工程；
(d) 工程(c)による免疫組織染色の程度を HRF タンパク質量の指標とし、正常生
体試料の結果と比較する工程；および
(e) 正常生体試料と比較して有意に高い HRF タンパク質存在量を、子宮内膜症
関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、
を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

9. 少なくとも標識化した請求項 2 の抗体を含むことを特徴とする子宮内膜症
関連疾患診断キット。

20 10. 少なくとも以下の要素：

- (a) 請求項 2 の抗体；および
(b) 標識化した請求項 3 の抗体

を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患診断キット。

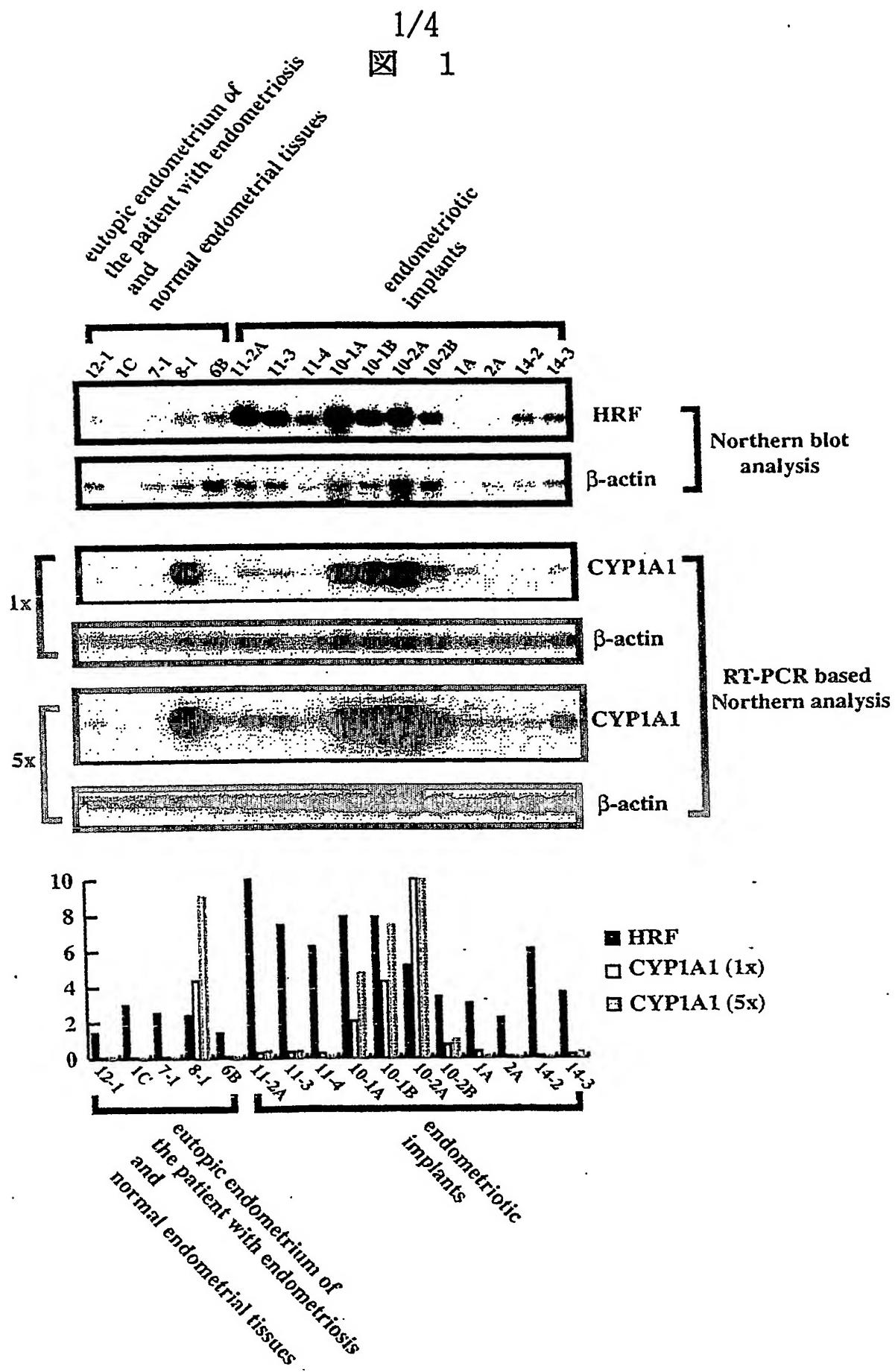
25 11. 少なくとも以下の要素：

- (a) 請求項 2 の抗体を固定化した担体；および
(b) 標識化した請求項 3 の抗体

を含むことを特徴とする子宮内膜症診断キット。

30 12. HRF タンパク質を認識し、かつ HRF タンパク質の活性を中和する抗体。

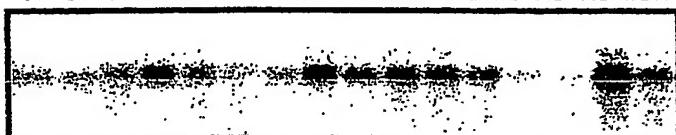
13. 請求項 12 の抗体を含有することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の治療薬。
14. 請求項 12 の抗体または請求項 13 の治療薬を体内に投与することを特徴と
5 する子宮内膜症関連疾患の治療方法。



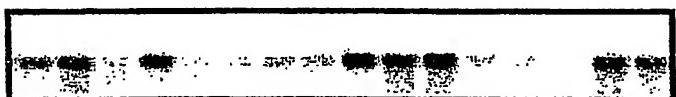
2/4
図 2

A

68 18.1 23 24.1 24.2 24.6 26.1 26.2 28.1 28.2 28.4 30.1 34 36 37.1 37.2
 N N N En En Eu En En Eu En En En En En Eu



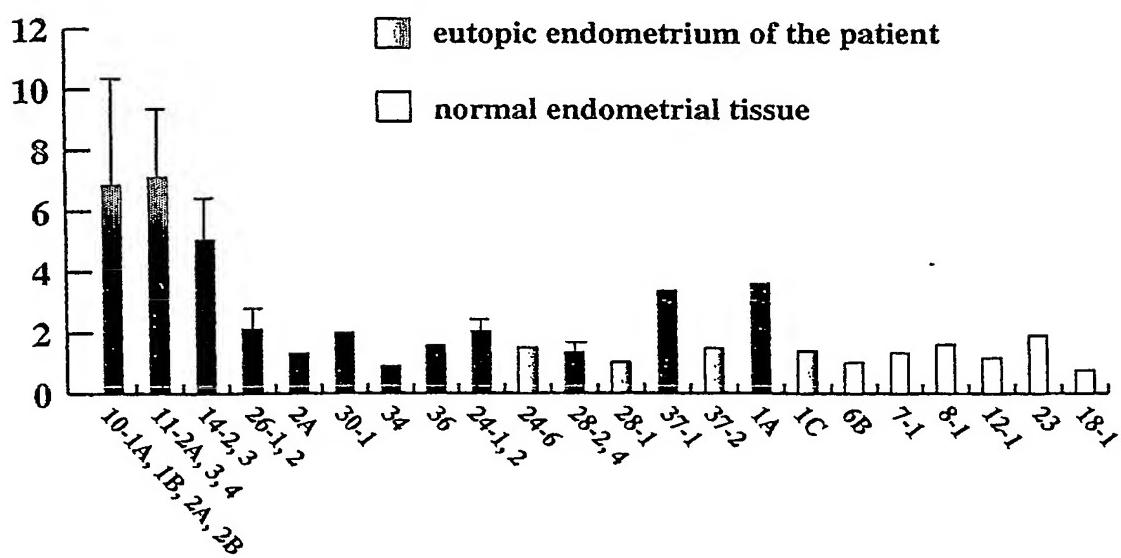
HRF

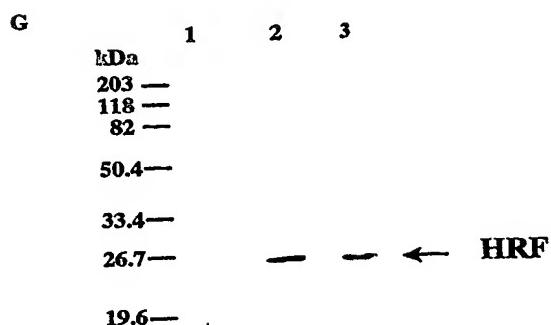
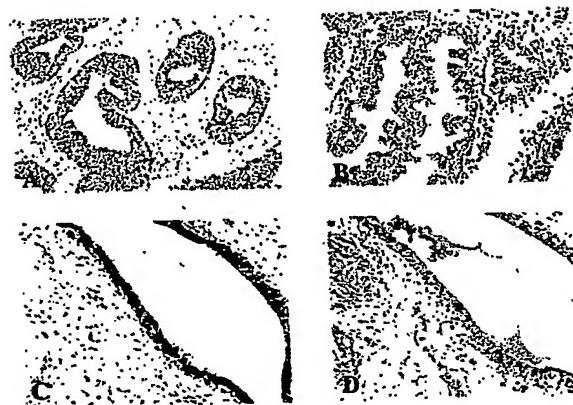
 β -actin**B**

endometriotic implant

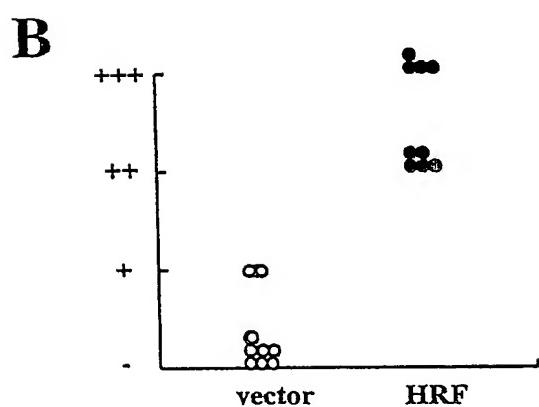
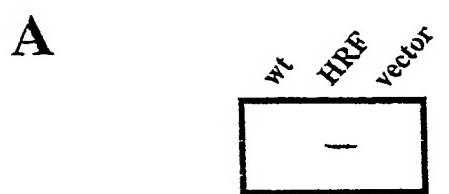
eutopic endometrium of the patient

normal endometrial tissue



3/4
図 3

4/4
☒ 4



1/5

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Diagnosis method of endometriosis

<130> 03-F-104PCT

<150> JP2003-196459

<151> 2003-07-14

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 830

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (95)..(613)

<223>

<400> 1

cccccccgag cgccgctccg gctgcaccgc gctcgctccg agtttcaggc tcgtgctaag 60

ctagcggcgt cgtcgtctcc cttagtgc catc atg att atc tac cgg gac ctc 115
Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu
1 5atc agc cac gat gag atg ttc tcc gac atc tac aag atc cgg gag atc 163
Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile
10 15 20gcg gac ggg ttg tgc ctg gag gtg gag ggg aag atg gtc agt agg aca 211
Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu Gly Lys Met Val Ser Arg Thr
25 30 35gaa ggt aac att gat gac tcg ctc att ggt gga aat gcc tcc gct gaa 259
Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu
40 45 50 55

2/5

ggc ccc gag ggc gaa ggt acc gaa agc aca gta atc act ggt gtc gat Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Ser Thr Val Ile Thr Gly Val Asp	307
60 65 70	
att gtc atg aac cat cac ctg cag gaa aca agt ttc aca aaa gaa gcc Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala	355
75 80 85	
tac aag aag tac atc aaa gat tac atg aaa tca atc aaa ggg aaa ctt Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu	403
90 95 100	
gaa gaa cag aga cca gaa aga gta aaa cct ttt atg aca ggg gct gca Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala	451
105 110 115	
gaa caa atc aag cac atc ctt gct aat ttc aaa aac tac cag ttc ttt Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe	499
120 125 130 135	
att ggt gaa aac atg aat cca gat ggc atg gtt gct cta ttg gac tac Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr	547
140 145 150	
cgt gag gat ggt gtg acc cca tat atg att ttc ttt aag gat ggt tta Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu	595
155 160 165	
gaa atg gaa aaa tgt taa caaatgtggc aattatttt gatctatcac Glu Met Glu Lys Cys	643
170	
ctgtcatcat aactggcttc tgcttgtcat ccacacaaca ccaggactta agacaaatgg	703
gactgatgtc atcttgagct cttcatttat ttgactgtg atttatttgg agtggaggca	763
ttgttttaa gaaaaacatg tcatgttaggt tgtctaaaaa taaaatgcat taaaactcat	823
ttgagag	830
<210> 2	
<211> 172	
<212> PRT	

3/5

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp
1 5 10 15
Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu
20 25 30
Gly Lys Met Val Ser Arg Thr Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile
35 40 45
Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser
50 55 60
Thr Val Ile Thr Gly Val Asp Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu
65 70 75 80
Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala Tyr Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met
85 90 95
Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys
100 105 110
Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn
115 120 125
Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly
130 135 140
Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met
145 150 155 160
Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Glu Met Glu Lys Cys
165 170

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 3

ccacaaccac caagaactgc ttag

24

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

4/5

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 4

gaagggggacg aaggaagagt g

21

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 5

gggaaatcgt gcgtgacgtt aag

23

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 6

tgtgtggcg tacaggtctt tg

22

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 7

ttggatccat gatcatctac cgggacctg

29

5/5

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 8
ttgaattctt aacatttc tc catctctaa 29

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 9
gcmcagatct atgattatct accgggac 28

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 10
ggccgaattc agatccaaaa taattgcc 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000160

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.C1⁷ G01N33/53, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁷ G01N33/53, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyō Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAS ON-LINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-503461 A (Reprogen, Inc.), 28 January, 2003 (28.01.03), & WO 01/01998 A & AU 200058376 A & EP 1191942 A & US 6544740 B	1,7-9
A	Nobuhiro SUZUMORI, Expression of secretory leukocyte protease inhibitor in women with endometriosis, FERTILITY AND STERILITY, Vol.72, No.5, pages 857 to 867, 1999	1,7-9
X	WO 94/12881 A (HOCHSTRASSER), 09 June, 1994 (09.06.94), & AU 9456946 A	2
X	WO 02/22170 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 21 March, 2002 (21.03.02),	2

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
06 February, 2004 (06.02.04)Date of mailing of the international search report
24 February, 2004 (24.02.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2004/000160**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention according to the above claim pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
2. Claims Nos.: 3 to 6, 10 to 14
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 and 7 to 11 (invention group 1) relate to methods of examining a disease relating to endometriosis by measuring the content dose of a histamine-release factor and a kit therefor, claims 2 to 6 (invention group 2) relate to an antibody binding to the HRF protein or a part thereof, and claims 12 to 14 (invention group 3) relate to antibodies recognized as usable in a remedy, a therapeutic method and a treatment.

As stated in WO 94/12881 A and WO 02/22170 A, the HRF protein had been known and thus the HRF protein cannot be considered as "a special technical feature".
(continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000160

Continuation of Box No. II-2 of continuation of first sheet(2)**Claims 3 to 6, 10 and 11**

Although the invention according to claim 3 relates to an antibody "binding to an epitope different from that of the antibody as claimed in claim 2", the epitope to which the antibody according to claim 2 binds is unclear. Moreover, it is also unclear to what the antibody according to claim 3 binds. Thus, it is unclear what antibodies are involved in the scope of the antibody according to claim 3. The same applies to the inventions according to claims 4 to 6, 10 and 11 depending on claim 3.

Claims 12 to 14

Although the invention according to claim 12 relates to an antibody which is restricted by a function of "neutralizing the activity of the HRF protein", it is unclear what antibodies are involved in the scope thereof. The same applies to the inventions according to claims 13 and 14 depending on claim 12.

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet(2)

No common matter is observed between the principle of the examination methods and the principle of the therapeutic method.

Thus, this international application has three groups of inventions.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' G01N 33/53 C07K 16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' G01N 33/53 C07K 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAS ON-LINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2003-503461 A(リプロジェクト インコーポレイテッド) 2003. 01. 28 & WO 01/01998 A & AU 200058376 A & EP 1191942 A US 6544740 B	1, 7-9
A	Nobuhiro Suzumori, Expression of secretory leukocyte protease inhibitor in women with endometriosis, FERTILITY AND STERILITY, vol. 72, no. 5, p. 857-867, 1999	1, 7-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 02. 2004

国際調査報告の発送日

24. 2. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

宮澤 浩

2 J 9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

國際調查報告

国際出願番号 PCT/JP2004/000160

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	WO 94/12881 A(HOCHSTRASSER) 1994.06.09 & AU 9456946 A	2
X	WO 02/22170 A(武田薬品工業株式会社) 2002.03.21	2

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
上記請求の範囲に係る発明は、人の身体の治療による処置方法に該当する。

2. 請求の範囲 3-6, 10-14 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

特別ページ参照

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1, 7-11（発明1）は、ヒスタミン放出因子の存在量を測定することにより子宮内膜症関連疾患を検査する方法及びそのためのキットであり、請求の範囲2-6（発明2）は、HRFタンパク質及びその一部と結合する抗体であり、請求の範囲12-14（発明3）は治療薬、治療方法及び治療に使用するものと認められる抗体である。

W094/12881A, W002/22170Aに記載されているように、HRFタンパク質は、従来より知られている。したがって、HRFタンパク質は「特別な技術的特徴」とは認められない。また、検査方法の原理と治療方法の原理との間において、共通性は認められない。

よって、この国際出願には3の発明が含まれている。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲 3-6, 10, 11について

請求の範囲3に係る発明は、「請求項2の抗体とは異なるエピトープと結合する」抗体であるが、請求の範囲2に係る抗体が結合するエピトープが明らかでなく、また請求の範囲3に記載された抗体が何に結合する抗体であるのかも明らかでないため、どのような抗体が含まれるのか明確でない。請求の範囲3を引用する請求の範囲4-6, 10, 11に係る発明も同様である。

請求の範囲12-14について

請求の範囲12に係る発明は、「HRFタンパク質の活性を中和」するという機能により限定された抗体であるが、どのような抗体が含まれるのか、明確ではない。請求の範囲12を引用する請求の範囲13, 14に係る発明も同様である。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.